8 月 August
2019，62(8)：901 – 911

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http：//www.insect.org.cn
doi：10.16380/j.kcxb.2019.08.002

四种鳞翅目害虫精氨酸激酶基因的表达谱及基于 RNAi 的功能分析

鲁艳辉，白　琪，郑许松，田俊策，吕仲贤*

（浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所，省部共建农产品质量安全国家重点实验室(筹)，杭州 310021）

摘要：【目的】精氨酸激酶(arginine kinase, AK)(EC 2.7.3.3)是昆虫体内重要的磷酸原激酶(能量代谢调节因子)，也是唯一能够形成有效 ATP 的磷酰基供体，起着与脊椎动物中肌酸激酶相同的作用。本研究旨在了解鳞翅目害虫 *AK* 基因的表达和功能。【方法】利用 qRT-PCR 方法测定 *AK* 基因在大螟 *Sesamia inferens*、二化螟 *Chilo suppressalis*、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 和斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 这 4 种鳞翅目害虫不同发育阶段和 3 龄幼虫不同组织中的表达谱；通过终点法检测了这 4 种害虫不同发育阶段和幼虫不同组织中的 AK 酶活性；采用 RNAi 技术抑制该基因的表达并分析其功能。【结果】*AK* 基因在大螟、二化螟、甜菜夜蛾和斜纹夜蛾这 4 种鳞翅目昆虫的不同发育阶段和 3 龄幼虫不同组织中均有表达，说明该基因的表达不具有发育时期和组织特异性。不同发育时期和 3 龄幼虫不同组织中 AK 酶活性与基因表达量变化趋势大体一致。注射以 *AK* 基因为靶标的 dsRNA 6 d 后，4 种害虫体内 *AK* 基因的 mRNA 表达下降 30% ~50%，AK 酶活性降低 30% 左右；14 d后幼虫的死亡率达 50% 左右，显著高于对照组幼虫的死亡率。【结论】*AK* 基因在上述 4 种鳞翅目害虫中为组成型表达，RNAi 抑制 *AK* 基因的表达可导致 4 种害虫的幼虫死亡，研究结果为开发以 *AK* 基因为靶标的鳞翅目害虫防治新技术提供了理论依据。

关键词：鳞翅目；大螟；二化螟；甜菜夜蛾；斜纹夜蛾；*AK* 基因；时空表达谱；酶活性；RNAi

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2019)08-0901-11

Expression profiling and RNAi-based function analysis of arginine kinase gene in four lepidopteran pests

LU Yan-Hui, BAI Qi, ZHENG Xu-Song, TIAN Jun-Ce, LÜ Zhong-Xian* (State Key Laboratory for Quality and Safety of Agro-products (in preparation), Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract:【Aim】Arginine kinase (AK) is an important phosphogen kinase (regulation factor of energy metabolism) in insects and the only phosphoryl donor that can form effective ATP. It plays the same role as creatine kinase in vertebrates. This study aims to clarify the expression and function of *AK* gene in lepidopteran pests.【Methods】We determined the expression profiles of *AK* gene in different developmental stages and tissues of the 3rd instar larvae by qRT-PCR, and assayed the AK activity in four lepidopteran pests, *Sesamia inferens*, *Chilo suppressalis*, *Spodoptera exigua* and *Spodoptera litura* by endpoint method. Furthermore, we analyzed the biological functions of *AK* genes in these four species by RNAi.【Results】qRT-PCR assay revealed that *AK* gene was expressed at all the developmental stages

基金项目：国家自然科学基金项目(31672050)；浙江省“三农六方”科技协作项目(CTZB-F170623LWZ-SNY1)

作者简介：鲁艳辉，女，1978 年 11 月生，河北唐山人，博士，副研究员，研究方向为水稻害虫抗药性及绿色防控，E-mail：luyanhui4321@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：luzxmh@163.com

收稿日期 Received：2019-03-19；接受日期 Accepted：2019-05-06

and in various tissues of the 3rd instar larvae of these four species, indicating that the expression of *AK* gene has no developmental stage and tissue specificity. The change trend of AK activities in different developmental stages and tissues of the 3rd instar larvae were similar with that of the expression levels of *AK* gene. At 6 d post injection of dsRNA targeting *AK* gene, the expression level of *AK* gene decreased by 30% –50% and the AK activity decreased by about 30% in these four species. At 14 d post injection of dsRNA targeting *AK* gene, the larval mortality rates of the four species were around 50%, which was significantly higher than those of the control groups. 【Conclusion】*AK* gene is constitutively expressed in the four lepidopteran pests. Inhibition of *AK* gene expression by RNAi can lead to the larval death of these four species. Our results provide a theoretical basis for developing new lepidopteran pest control technologies targeting *AK* gene.

Key words: Lepidoptera; *Sesamia inferens*; *Chilo suppressalis*; *Spodoptera exigua*; *Spodoptera litura*; *AK* gene; spatio-temporal expression profile; enzyme activity; RNAi

鳞翅目(Lepidoptera)是地球上种类最丰富和最容易识别的昆虫类群之一。大螟 *Sesamia inferens* 和二化螟 *Chilo suppressalis* 是水稻的主要钻蛀性害虫，分属于鳞翅目夜蛾科(Noctuidae)和草螟科(Crambidae),在我国水稻产区均有发生,直接威胁农业生产。水稻钻蛀性螟虫在苗期为害水稻可造成枯鞘、枯心,在孕穗期和穗期为害可造成枯孕穗、白穗及虫伤株等,严重影响水稻的质量和产量(鲁艳辉等, 2016a, 2016b)。近年来,随着种植结构和耕作制度调整,杂交水稻面积逐年增加(彭少兵, 2016),使得越冬代有效虫源面积扩大,更加剧了螟虫的危害(鲁艳辉等, 2017)。甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 和斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 均属于鳞翅目夜蛾科,是世界性分布的杂食性重要害虫,在气候和食物适宜时,能在短时间内给蔬菜、棉花等重要农作物造成严重为害(Greenberg *et al*., 2001; Huang and Han, 2007; 桑松等, 2013)。目前,对于以上4种鳞翅目害虫的防治,我国多采用化学药剂。但由于化学药剂的不合理使用,导致害虫抗药性水平不断提高,田间防效下降,残虫数量增加,从而加大了这些害虫的危害。害虫抗药性的产生不仅严重影响杀虫剂的防治效果和农产品的产量和质量,而且对环境生态安全和食品安全造成严重影响。因此,在控制害虫抗药性的策略上,筛选新的杀虫剂作用靶标,开发应用新型高选择性杀虫剂品种,探索既能避免抗药性的产生又能达到有效控制害虫的新技术(Huvenne and Smagghe, 2010),已成为农药创新领域科研工作者的主要任务。

磷酸原激酶是一大类酶的总称,多位于动物体内能量消耗较大的组织,比如肌肉、脑、神经等,对动物体内能量的储存、代谢和利用至关重要(Newsholme *et al*., 1978; Ellington, 1989)。肌酸激酶(creatine kinase, CK)、胍基牛磺酸激酶(taurocyamine kinase, TK)、胍基乙酸激酶(guanidinoacetate kinase, GK)、胍乙基磷酸丝氨酸激酶(lombricine kinase, LK)和精氨酸激酶(arginine kinase, AK)都属于磷酸原激酶,但目前研究最多的磷酸原激酶是CK和AK。AK可通过催化精氨酸和ATP之间的可逆性反应,将能量存储于磷酸精氨酸的高能磷酸键中,或将磷酸精氨酸分解产生ATP(王华兵和徐豫松, 2006)。此反应对无脊椎动物体内的能量代谢、储存和利用起关键的调节作用。众多研究表明,精氨酸激酶仅存在于无脊椎动物体内,且是昆虫体内唯一能够形成有效ATP的磷酰基供体,这意味着昆虫体内能量代谢途径不同于脊椎动物(Awama *et al*., 2007; Tanaka *et al*., 2007; 张元臣等, 2013)。Kucharski 和 Maleszka(1998)率先从西方蜜蜂 *Apis mellifera* 中克隆了精氨酸激酶的cDNA序列。随后,印度谷螟 *Plodia interpunctella*(Binder *et al*., 2001)、美洲大蠊 *Periplaneta Americana*(Brown *et al*., 2004)、东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis*(Li *et al*., 2006)、大红芫青 *Cissites cephalotes*(Tanaka *et al*., 2007)、家蚕 *Bombyx mori*(王华兵和徐豫松, 2006)和棉铃虫 *Helicoverpa armigera*(Liu *et al*., 2009)等多种昆虫中的 *AK* 基因全长序列被克隆,推动了昆虫精氨酸激酶研究的发展。经研究发现,*AK* 基因在昆虫不同组织、不同发育时期均有表达,且表达量存在着一定的差异(王华兵和徐豫松, 2006)。但是,关于昆虫 *AK* 基因的结构、表达、调控及RNAi的研究并不多,尤其 *AK* 基因的RNAi,目前只在褐飞虱 *Nilaparvata lugens*(袁淼, 2014)、小菜蛾 *Plutella xylostella*(陈金枝, 2014)、棉铃虫(Liu *et al*.,

2015；Qi *et al*., 2015）中有报道。但是研究 *AK* 基因的表达调控及 RNAi 分析对阐明昆虫体内的能量代谢、储存和利用的调节机理以及开发新的药剂作用靶标或新型害虫防治措施具有非常重要的意义。

因此，本研究以两种重要的水稻害虫大螟和二化螟以及两种重要的蔬菜害虫甜菜夜蛾和斜纹夜蛾为研究对象，测定其 *AK* 基因的时空表达谱和 AK 酶活性，并利用 RNAi 技术分析了抑制 *AK* 基因表达对这 4 种害虫的 AK 酶活性及幼虫死亡率的影响，为开发以 *AK* 基因为靶标的害虫防治新技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

大螟和二化螟幼虫于 2016 年采自萧山区水稻田，试虫采用人工饲料在人工气候室饲养，饲料配方及饲养方法参考中国水稻研究所的方法（李腾武等，2001；涂业苟和曾吉华，2010；戴长庚等，2013；胡阳等，2013）。甜菜夜蛾和斜纹夜蛾的幼虫于 2016 年分别采自浙江省杭州市萧山区甘蓝田（120°12′E，30°04′N）和金华莲藕田（119°38′E，29°04′N）。饲养条件：温度 27 ±1℃，相对湿度 70% ± 5%，光周期 16L∶8D。成虫用 10% 的蜂蜜水饲养。室内饲养 4 代后用于后续实验。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 第 1 链合成

4 种试虫的所有样本总 RNA 提取采用 Trizol 试剂（Invitrogen），具体步骤参照说明书。取 1 μL RNA 样品测定 OD_{260}/OD_{280}（NanoDrop 2000），比值在 1.8 ~2.2 之间的样品用于 cDNA 合成。

cDNA 合成：取 1.0 μg 总 RNA，以 Oligo dT 为引物合成 cDNA，操作步骤参照 Thermo Fisher 反转录试剂盒说明书。cDNA 于 –20℃保存备用。

1.3 *AK* 基因 mRNA 的时空表达谱分析

不同发育阶段样品：收集 4 种试虫不同发育阶段的样本，包括 1 日龄卵，1 –5 或 6 龄幼虫，1 日龄蛹，初羽化的雌雄成虫。

不同组织样品：从 4 种试虫中分别选取个体大小一致的 3 龄幼虫，在预冷的生理盐水中解剖，分别获取头、中肠、脂肪体、表皮和血淋巴。

按照步骤 1.2 节所述提取 4 种昆虫各样品总 RNA，反转录合成 cDNA，分别以大螟 *RPS3*（GenBank 登录号：DQ988989）、二化螟 *β-tubulin*（GenBank 登录号：EU429675）、甜菜夜蛾 *GADPH*（GenBank 登录号：AEJ38217）和斜纹夜蛾 *GADPH*（GenBank 登录号：HQ012003）为内参基因，对 *AK* 基因 mRNA 表达量进行 qRT-PCR 检测。由于大螟 *AK*（GenBank 登录号：MK559476）、二化螟 *AK*（GenBank 登录号：MK559475）、甜菜夜蛾 *AK*（GenBank 登录号：GQ379235）和斜纹夜蛾 *AK*（GenBank 登录号：HQ840714）基因 cDNA 序列的一致性很高，达 95% 以上（数据未发表），所以用于 qRT-PCR 的引物序列是相同的（表 1）。PCR 反应体系（20 μL）：SYBR（Bio-Rad）10 μL，上下游引物（10 mmol/L）各 1 μL，cDNA 模板 1 μL，ddH_2O 7 μL。PCR 反应条件：95℃预变性 10 s；95℃ 5 s，60℃ 30 s，40 个循环。制作融解曲线，确定扩增产物的特异性。每个样品 3 个生物学重复，3 个技术重复，每个生物学重复 5 头幼虫。

1.4 AK 酶活性测定

采用终点法测定 AK 酶活性。将 1.3 节分别收集的 4 种鳞翅目昆虫不同发育阶段和 3 龄幼虫不同组织部位的样品在 5 mL 冰冻甘氨酸缓冲液中匀浆（含 250 mmol/L 甘氨酸，10 mmol/L 2-巯基乙醇，1 mmol/L 乙二胺四乙酸，0.1 mmol/L DTT 和 1 mmol/L PMSF，pH 8.6）。匀浆液在 4℃ 10 000 g 条件下离心 15 min。上清液用于 AK 酶活性和总蛋白质的测定，采用酶标仪（Molecular Devices Spectra Max 190）参照昆虫 AK-ELISA 检测试剂盒（艾美捷科技有限公司）说明书测定酶活性。每个样品重复 3 次。

1.5 *AK* 基因的 RNAi 实验

以 1.2 节合成的 4 种昆虫 cDNA 为模板，以 RNAi-F/RNAi-R 为引物（表 1）进行 PCR 扩增，PCR 反应体系（50 μL）：Buffer Mix 25 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 2 μL，cDNA 模板 2 μL，ddH_2O 19 μL。PCR 反应条件：94℃ 3 min；94℃ 30 s，60℃ 30 s，5 个循环；72℃延伸 45 s；之后再 30 个循环：94℃ 30 s，65℃ 30 s，72℃ 45 s；最后 72℃延伸 10 min。以纯化后的 PCR 产物为模板，采用 TranscriptAid™ T7 High Yield Transcription Kit（Thermo Fisher Scientific）合成 dsRNA，具体步骤参照试剂盒说明书。

选取大小一致、蜕皮后第 1 天的 3 龄期 4 种昆虫，分别从第 1 腹足和第 2 腹足之间通过显微注射将 *AK* dsRNA 注入体腔。每头注射 1 μg dsRNA（1.0 μg/μL），分别以注射 pH 7.0 的 PBS 和 *GFP* dsRNA（由浙江省农业科学院张珏锋老师提供）作为空白

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

引物 Primers	引物序列(5′-3′) Primer sequences	Tm(℃)	产物长度(bp) Product length	参考文献 References	用途 Purpose
RT-F	CTGAAGAAGTACCTTACC	60	80		qRT-PCR 中 *AK* 基因扩增
RT-R	CAATCCAGCAGAGTTGAG	60			Amplification of *AK* in qRT-PCR
SexRT-F	CTGAGGAACAGGTCGTGTCATCCGA	60	150	Zhu *et al*., 2014	qRT-PCR 中甜菜夜蛾 *GADPH* 扩增
SexRT-R	GATCGATAACGCGGTTGGAGTAGCC	60			Amplification of *GADPH* of *Spodoptera exigua* in qRT-PCR
SliRT-F	GGGTATTCTTGACTACAC	60	184	Lu *et al*., 2013	qRT-PCR 中斜纹夜蛾 *GADPH* 扩增
SliRT-R	CTGGATGTACTTGATGAG	60			Amplification of *GADPH* of *Spodoptera litura*
SinRT-F	CCCAGATAATCATTATCG	60	191	Lu *et al*., 2015	qRT-PCR 中大螟 *RPS3* 扩增
SinRT-F	AGTACTGAATCGACAAGCTC	60			Amplification of *RPS3* of *Sesamia inferens* in qRT-PCR
CsuNG-F	AAATCACGTCTGGCAACCCT	60	125	徐红星等, 2019	qRT-PCR 中二化螟 *β-tubulin* 扩增
CsuNG-R	TTAGCCGCTTTCTTGACGGT	60			Amplification of *β-tubulin* of *Chilo suppressalis* in qRT-PCR
RNAi-F	TAATACGACTCACTATAGGGCCAGTCTGGTGTTGAGAACT	67	490		*AK* 基因 dsRNA 合成
RNAi-R	TAATACGACTCACTATAGGGGGTCTTGTTCTCATTGTGGT	66			Synthesis of dsRNA targeting *AK* gene

对照和阳性对照。每个处理注射 30 头,3 次生物学重复。注射后的试虫放置在正常的饲养条件下饲养(见 1.1 节),第 2 天检查剔除因机械损伤死亡的试虫(死亡率 <10%)。取注射后 6 d 的样品,分别利用 qRT-PCR(见 1.3 节)和终点法(见 1.4 节)检测 *AK* 基因表达水平和 AK 酶活性。14 d 后统计试虫死亡率。

1.6　数据分析

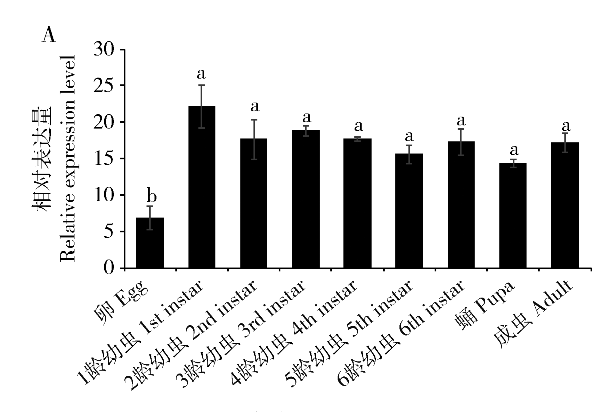
qRT-PCR 数据采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$方法处理。*AK* 基因的相对表达量、幼虫死亡率和 AK 酶活性的数据均采用 DPS 软件进行单因素方差分析,并进行 Tukey 氏多重比较($P<0.05$)。

2　结果

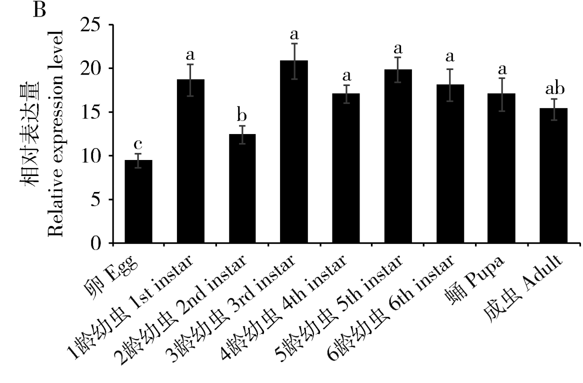
2.1　4 种鳞翅目害虫 *AK* 基因的时空表达谱

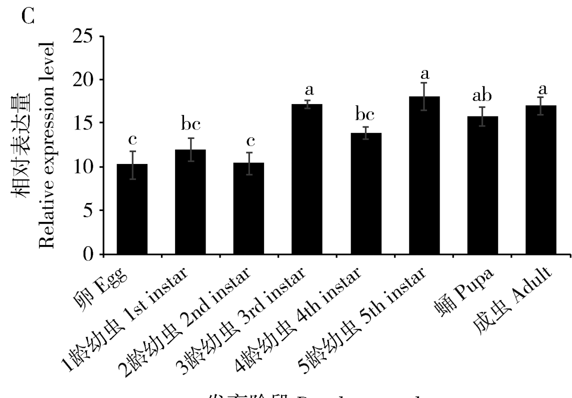
AK 基因在 4 种鳞翅目害虫的不同发育时期均有表达,且各个发育时期的表达量变化范围较小(图 1)。*AK* 基因在大螟 1 龄幼虫到成虫各龄期的表达量无显著差异($P>0.05$),但都显著高于卵中的表达量($P<0.05$)(图 1：A);同样,在二化螟 1 龄幼虫到成虫中表达量相对较高,显著高于在卵中的表达量(图 1：B);在甜菜夜蛾 3 龄幼虫、5 龄幼虫、蛹及成虫中表达量较高,在卵和 2 龄幼虫中表达量较低(图 1：C);在斜纹夜蛾 1, 3 和 6 龄幼虫中表达量相对较高,4 龄幼虫、5 龄幼虫、蛹和成虫中的表达量次之,且无显著差异($P>0.05$),在卵中表达量最低(图 1：D)。

AK 基因在 4 种鳞翅目害虫 3 龄幼虫所有测定的组织中均有表达(图 2)。*AK* 基因在大螟和甜菜夜蛾表皮中表达量均最高,在血淋巴和脂肪体中表达最低(图 2：A, C);在二化螟表皮和中肠中表达量最高,在脂肪体和血淋巴中的表达量最低(图 2：B);在斜纹夜蛾表皮中表达量也最高,在脂肪体中









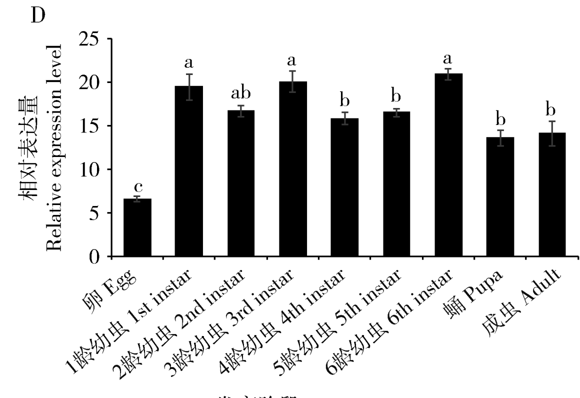


图 1　*AK* 基因在大螟(A)、二化螟(B)、甜菜夜蛾(C)和斜纹夜蛾(D)不同发育阶段的表达模式

Fig. 1　Expression pattern of *AK* gene in different developmental stages of *Sesamia inferens* (A), *Chilo suppressalis* (B), *Spodoptera exigua* (C) and *Spodoptera litura* (D)

图中数据为 3 次生物学重复的平均值 ± 标准误。不同字母表示 *AK* 基因在不同发育阶段表达量之间有显著差异,统计分析采用 DPS 的单因素方差分析并进行 Tukey 氏多重比较($P<0.05$)。图 2 同。The data in the figure are means ± *SE* of three biological replications. Different small letters above bars stand for significant difference in gene expression level at different developmental stages (ANOVA followed by Tukey's multiple comparison, $P<0.05$). The same for Fig. 2.

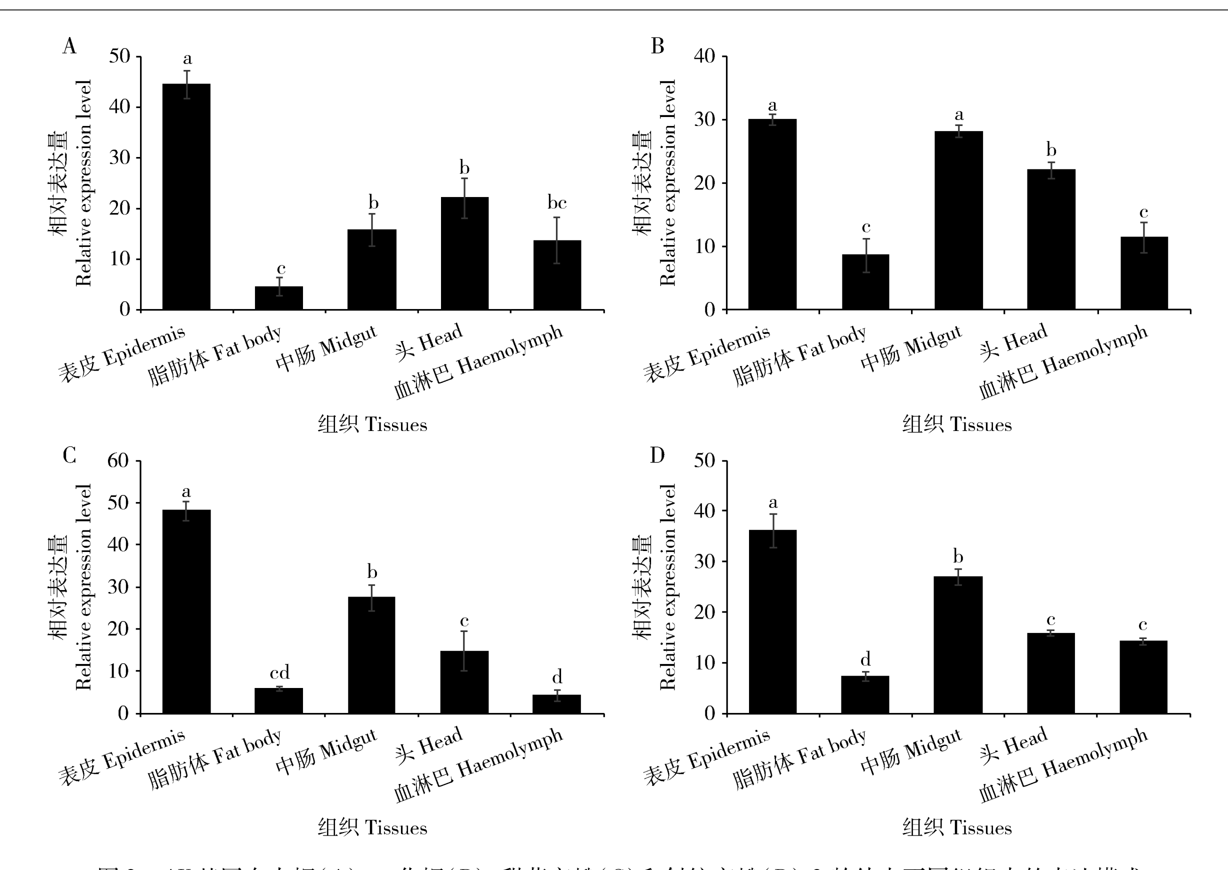


图 2　*AK* 基因在大螟(A)、二化螟(B)、甜菜夜蛾(C)和斜纹夜蛾(D) 3 龄幼虫不同组织中的表达模式

Fig. 2　Expression pattern of *AK* gene in different tissues of the 3rd instar larvae of *Sesamia inferens* (A) and *Chilo suppressalis* (B), *Spodoptera exigua* (C) and *Spodoptera litura* (D)

表达量最低,头部和血淋巴中的表达量无显著差异($P>0.05$)(图 2: D)。

2.2　4 种鳞翅目害虫不同发育时期的 AK 酶活性

不同发育时期 AK 酶活性测定结果显示,AK 酶活性在 4 种昆虫中均呈现出随虫龄增加而增加的趋势,即卵和低龄幼虫中 AK 酶活性最低,成虫的 AK 酶活性最高,只有大螟和斜纹夜蛾蛹期的酶活性突然降低(图 3: A, D)。大螟、二化螟、甜菜夜蛾和斜纹夜蛾 4 种昆虫不同发育阶段 AK 酶活性最高值和最低值之间分别相差 6.7, 4.8, 5.3 和 4.1 倍(图 3: A–D)。

在 4 种鳞翅目害虫中,表皮和中肠的 AK 酶活性相对较高,其次是头部、血淋巴和脂肪体,与 *AK* 基因的相对表达量变化趋势基本一致(图 4: A–D)。

2.3　注射 dsRNA 对 *AK* 基因 mRNA 的沉默效果

注射 3 龄幼虫 dsRNA 6 d 后,检测 *AK* 基因 mRNA 表达量。与注射 PBS 的空白对照和注射 ds*GFP* 的阳性对照组相比,注射 *AK* 基因的 dsRNA 处理组 *AK* 基因表达量在 4 种试虫中均显著下降($P<0.05$),降幅约为 30% ~50%(图 5),其中斜纹夜蛾 *AK* 基因表达量降幅最大。

2.4　注射 dsRNA 对 AK 酶活性水平的影响

注射 3 龄幼虫 dsRNA 6 d 后,检测 AK 酶活性。与 mRNA 表达量测定结果相似,与注射 PBS 的空白对照和注射 ds*GFP* 的阳性对照组相比,注射 *AK* 基因 dsRNA 的处理组试虫的 AK 酶活性显著下降($P<0.05$),在 4 种昆虫中均下降了 30% 左右(图 6)。

2.5　注射 dsRNA 后 4 种鳞翅目害虫的死亡率

注射 3 龄幼虫 dsRNA 14 d 后,统计试虫死亡率。ds*GFP* 阳性对照组和空白对照组试虫死亡率无显著差异($P>0.05$)。而注射 *AK* dsRNA 的处理组幼虫死亡率在 4 种试虫中均达到 50% 左右,均显著高于两个对照组($P<0.05$),与 ds*GFP* 阳性对照组相比,死亡率分别提高了 121.4%, 58.8%, 110.3% 和 171.2% (图 7)。

3　讨论

目前,已在膜翅目、鳞翅目、鞘翅目、直翅目、双翅目和蜚蠊目等昆虫中发现精氨酸激酶(朱家颖,

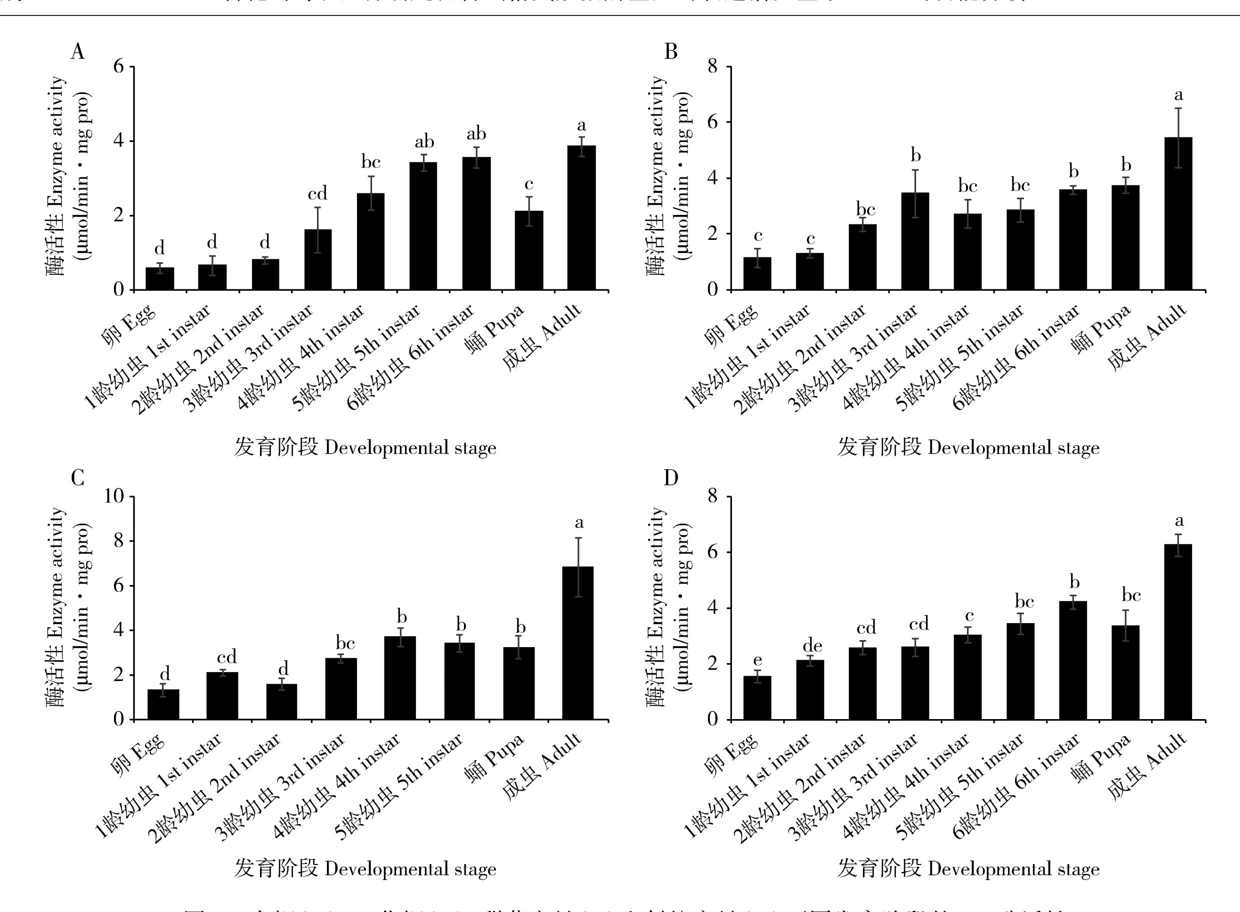


图 3　大螟（A）、二化螟（B）、甜菜夜蛾（C）和斜纹夜蛾（D）不同发育阶段的 AK 酶活性

Fig. 3　AK activities in different developmental stages of *Sesamia inferens* (A), *Chilo suppressalis* (B), *Spodoptera exigua* (C) and *Spodoptera litura* (D)

图中数据为 3 次生物学重复的平均值 ± 标准误。柱上不同字母表示 AK 酶活性在不同发育阶段之间有显著差异，统计分析采用 DPS 的单因素方差分析并进行 Tukey 氏多重比较（$P < 0.05$）。图 4 同。The data in the figure are means ± *SE* of three biological replications. Different small letters above bars stand for significant difference in enzyme activities at different developmental stages (ANOVA followed by Tukey's multiple comparison, $P < 0.05$). The same for Fig. 4.

2009；Werr and Gramer, 2009；闫浩等, 2011；王磊, 2012）。研究表明，精氨酸激酶仅存在于无脊椎动物体内，且是昆虫体内唯一能够形成有效 ATP 的磷酰基供体（郑雅楠等, 2018）。现已有研究者对昆虫精氨酸激酶的基因结构、分子克隆、表达纯化进行了系统的研究，关于昆虫精氨酸激酶功能的研究主要集中在参与能量转化和生长发育、维持自身免疫等。

本研究对大螟、二化螟、甜菜夜蛾和斜纹夜蛾 4 种重要的鳞翅目害虫的精氨酸激酶基因表达和酶活性的时空变化进行了测定。*AK* 基因的时空表达谱分析表明该基因在这 4 种害虫不同发育时期和 3 龄幼虫不同组织中均有不同程度的表达（图 1 和 2），说明该基因的表达不具备发育阶段特异性和组织特异性，为组成型表达。不同发育时期 *AK* 基因表达结果显示幼虫、蛹和成虫期的表达量相对较高（图 1），这可能与这些发育阶段的能量代谢比较旺盛有关。3 龄幼虫不同组织 *AK* 基因表达结果显示在 4 种害虫的表皮、中肠和头部中的表达量相对较高（图 2）。同样，家蚕幼虫中肠中 *AK* 基因表达量较高（Kang *et al.*, 2011），红火蚁 *Solenopsis invicta* 头部的 *AK* 基因表达量也较高（Wang *et al.*, 2009）。此外，不同发育阶段和 3 龄幼虫不同组织中 AK 酶活性的变化（图 3 和 4）也表现出与 *AK* 基因表达类似的趋势。昆虫不同组织器官中存在较高含量的 AK，说明该酶在昆虫的不同组织器官中均发挥着重要作用。

为进一步研究抑制 *AK* 基因的表达对 4 种鳞翅目害虫的影响，我们利用 RNAi 技术对 *AK* 基因的表达进行干扰，发现 6 d 后的 mRNA 沉默效率在 30% ~ 50% 左右（图 5），AK 酶活性同样下降了 30% 左右（图 6）。袁淼（2014）注射 dsRNA 对褐飞虱 AK 基因表达的抑制率达 50% ~70%；徐秀凤（2012）利用不同系统表达 *AK* 基因的 dsRNA 菌液饲喂小菜蛾，

A
酶活性 Enzyme activity (μmol/min · mg pro)
2
1.5
1
0.5
0
a
c
b
bc
bc
表皮 Epidermis
脂肪体 Fat body
中肠 Midgut
头 Head
血淋巴 Haemolymph
组织 Tissues

B
酶活性 Enzyme activity (μmol/min · mg pro)
2
1.5
1
0.5
0
a
c
a
ab
bc
表皮 Epidermis
脂肪体 Fat body
中肠 Midgut
头 Head
血淋巴 Haemolymph
组织 Tissues

C
酶活性 Enzyme activity (μmol/min · mg pro)
2
1.5
1
0.5
0
a
c
ab
bc
c
表皮 Epidermis
脂肪体 Fat body
中肠 Midgut
头 Head
血淋巴 Haemolymph
组织 Tissues

D
酶活性 Enzyme activity (μmol/min · mg pro)
2
1.5
1
0.5
0
a
c
ab
bc
c
表皮 Epidermis
脂肪体 Fat body
中肠 Midgut
头 Head
血淋巴 Haemolymph
组织 Tissues

图 4　大螟(A)、二化螟(B)、甜菜夜蛾(C)和斜纹夜蛾(D) 3 龄幼虫不同组织中的 AK 酶活性

Fig. 4　AK activities in different tissues of the 3rd instar larvae of *Sesamia inferens* (A), *Chilo suppressalis* (B), *Spodoptera exigua* (C) and *Spodoptera litura* (D)

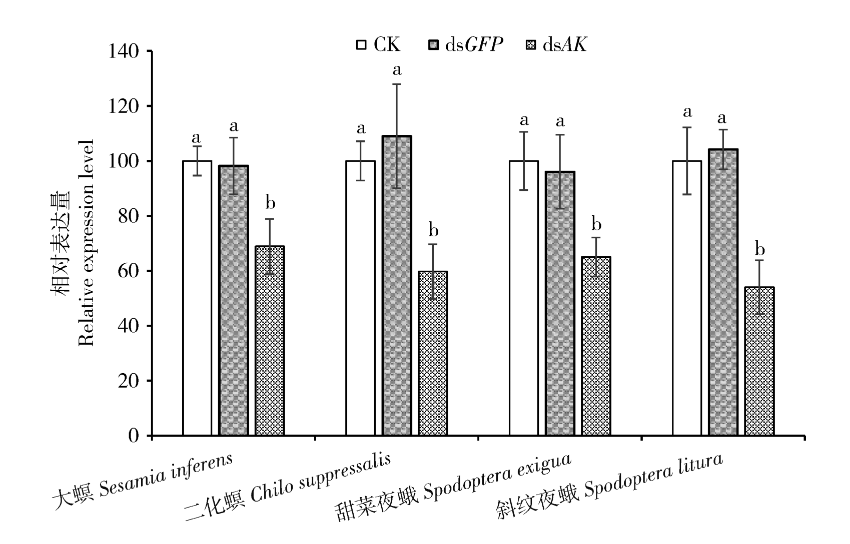


图 5　RNAi 6 d 后 *AK* 基因在大螟、二化螟、甜菜夜蛾和斜纹夜蛾 3 龄幼虫中的相对表达量

Fig. 5　Relative expression levels of *AK* gene in the 3rd instar larvae of *Sesamia inferens*, *Chilo suppressalis*, *Spodoptera exigua* and *Spodoptera litura* after RNAi for 6 d

CK: 注射 PBS (pH 7.0)作为空白对照 Blank control injected with PBS (pH 7.0); ds*GFP*: 阳性对照 Positive control; ds*AK*: *AK* 基因 dsRNA 处理 *AK* dsRNA treatment. 图中数据为 3 次生物学重复的平均数值 ± 标准误。同种昆虫中柱上不同字母表示差异显著(采用单因素方差分析并进行 Tukey 氏多重比较, $P<0.05$)。图 6 和图 7 同。The data in the figure are means ± *SE* of three biological replications. Different small letters above bars in the same species stand for significant difference (ANOVA followed by Tukey's multiple comparison, $P<0.05$). The same for Figs. 6 and 7.

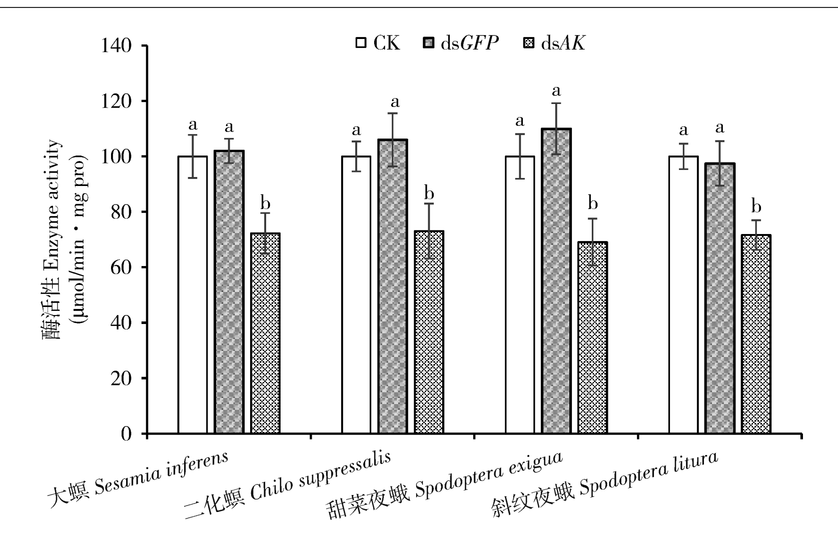


图 6　RNAi 干扰 *AK* 基因 6 d 后大螟、二化螟、甜菜夜蛾和斜纹夜蛾 3 龄幼虫的 AK 酶活性

Fig. 6　AK activities in the 3rd instar larvae of *Sesamia inferens*, *Chilo suppressalis*, *Spodoptera exigua* and *Spodoptera litura* after RNAi of *AK* gene for 6 d

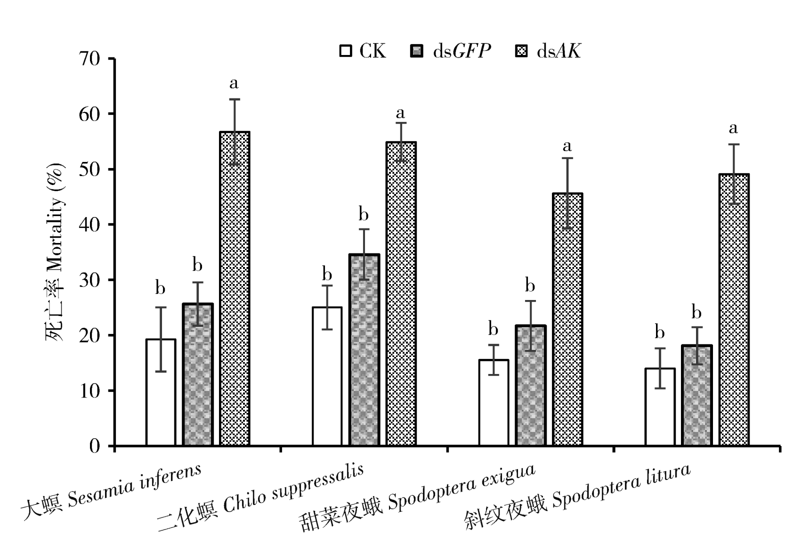


图 7　RNAi 干扰 *AK* 基因 14 d 后大螟、二化螟、甜菜夜蛾和斜纹夜蛾 3 龄幼虫死亡率

Fig. 7　Mortality of the 3rd instar larvae of *Sesamia inferens*, *Chilo suppressalis*, *Spodoptera exigua* and *Spodoptera litura* after RNAi of *AK* gene for 14 d

其抑制率在 40% ~70%。本研究中对 3 龄幼虫 *AK* 基因进行 RNAi 14 d 后，处理组幼虫死亡率显著高于对照组，均达到 50% 左右（图 7）。类似地，袁淼（2014）干扰褐飞虱 3 龄若虫的 *AK* 基因 3 d 后，其死亡率最高也达 51%；徐秀凤（2012）利用表达 *AK* 基因的 dsRNA 菌液饲喂小菜蛾幼虫，其死亡率最高为 40%。可见，对不同昆虫的 *AK* 基因进行干扰均可引起昆虫的死亡，进一步证明该基因在昆虫中的生命活动中发挥着重要功能。

总体来看，目前关于昆虫 *AK* 基因的研究大都集中在基因的克隆与进化关系分析上，利用 RNAi 技术研究昆虫 *AK* 基因功能的并不多。本研究以 4 种常见的鳞翅目害虫为研究对象，并测定了这 4 种害虫 *AK* 基因表达及酶活性的时空变化，并利用 RNAi 技术分析了抑制 *AK* 基因对其表达、酶活性和幼虫死亡率的影响。初步明确抑制 *AK* 基因的表达可提高这 4 种害虫幼虫的死亡率，为开发以 *AK* 基因为靶标的害虫防治新技术提供了理论依据。

参考文献（References）

Awama AM, Mazon H, Vial C, Marcillat O, 2007. Despite its high similarity with monomeric arginine kinase, muscle creatine kinase is only enzymatically active as a dimer. *Arch. Biochem. Biophys.*, 458(2): 158 – 166.

Binder M, Mahler V, Hayek B, Sperr WR, Schöller M, Prozell S,

Wiedermann G, Valent P, Valenta R, Duchêne M, 2001. Molecular and immunological characterization of arginine kinase from the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*, a novel cross-reactive invertebrate panallergen. *J. Immunol.*, 167(9): 5470 – 7477.

Brown AE, France RM, Grossman SH, 2004. Purification and characterization of arginine kinase from the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 56(2): 51 – 60.

Chen JZ, 2014. RNA Interference of Arginine Kinase in *Plutella xylostella* Mediated by *Bacillus thuringiensis*. MSc Thesis, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou. [陈金枝, 2014. 苏云金芽孢杆菌介导的小菜蛾精氨酸激酶基因的 RNA 干扰. 福州: 福建农林大学硕士学位论文]

Dai CG, Li KL, Wang LF, Tan XS, Hu Y, Yuan ZM, Fu Q, 2013. An oligidic diet for *Sesamia inferens* optimized by uniform design and successive rearing. *Chin. J. Rice Sci.*, 27(4): 434 – 439. [戴长庚, 李凯龙, 王立峰, 谭显胜, 胡阳, 袁哲明, 傅强, 2013. 基于均匀设计优化的大螟实用饲料配方及继代饲养. 中国水稻科学, 27(4): 434 – 439]

Ellington WR, 1989. Phosphocreatine represents a thermodynamic and functional improvement over other muscle phosphagens. *J. Exp. Biol.*, 143(1): 177 – 194.

Greenberg SM, Sappington TW, Legaspi BC, Liu TX, Sétamou M, 2001. Feeding and life history of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host plants. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 94(4): 566 – 575.

Hu Y, Zheng YL, Cao GL, Fu Q, 2013. A technique for rearing *Chilo suppressalis* in the large scale with an oligidic diet in laboratory. *Chin. J. Rice Sci.*, 27(5): 535 – 538. [胡阳, 郑永利, 曹国连, 傅强, 2013. 利用半人工饲料大规模简便化饲养二化螟. 中国水稻科学, 27(5): 535 – 538]

Huang S, Han Z, 2007. Mechanisms for multiple resistances in field populations of common cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) in China. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 87(1): 14 – 22.

Huvenne H, Smagghe G, 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *J. Insect Physiol.*, 56(3): 227 – 235.

Kang L, Shi H, Liu X, Zhang CY, Yao Q, Wang Y, Chang C, Shi J, Cao J, Kong J, Chen KP, 2011. Arginine kinase is highly expressed in a resistant strain of silkworm (*Bombyx mori*, Lepidoptera): implication of its role in resistance to *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 158(3): 230 – 234.

Kucharski R, Maleszka R, 1998. Arginine kinase is highly expressed in the compound eye of the honey bee, *Apis mellifera*. *Gene*, 211(2): 343 – 349.

Li M, Wang XY, Bai JG, 2006. Purification and characterization of arginine kinase from locust. *Protein Pept. Lett.*, 13(4): 405 – 410.

Li TW, Yang CZ, He JX, Yang HF, Wang XL, 2001. The artificial diet and the mass rearing method of *Spodoptera exigua*. *Entomol. Knowl.*, 38(5): 383 – 386. [李腾武, 杨崇珍, 何将绪, 杨红峰, 王兴林, 2001. 甜菜夜蛾人工饲料及饲养技术研究. 昆虫知识, 38(5): 383 – 386]

Liu F, Wang XD, Zhao YY, Li YJ, Liu YC, Sun J, 2015. Silencing the *HaAK* gene by transgenic plant-mediated RNAi impairs larval growth of *Helicoverpa armigera*. *Int. J. Biol. Sci.*, 11(1): 67 – 74.

Liu Z, Xia L, Wu Y, Xiao Q, Chen J, Roux KH, 2009. Identification and characterization of an arginine kinase as a major allergen from silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 150(1): 8 – 14.

Lu YH, Gao GC, Zheng XS, Lü ZX, 2017. The lethal mechanism of trap plant *Vetiveria zizanioides* against the larvae of *Chilo suppressalis*. *Sci. Agric. Sin.*, 50(3): 486 – 495. [鲁艳辉, 高广春, 郑许松, 吕仲贤, 2017. 诱集植物香根草对二化螟幼虫致死的作用机制. 中国农业科学, 50(3): 486 – 495]

Lu YH, Gao GC, Zheng XS, Wang GR, Lü ZX, 2016a. Effect of growth stages and nitrogen fertilization on the volatiles of rice stem borer trap plant vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*). *Chin. J. Biol. Control*, 32(5): 604 – 609. [鲁艳辉, 高广春, 郑许松, 王国荣, 吕仲贤, 2016a. 不同生育期和氮肥水平对水稻螟虫诱集植物香根草挥发物的影响. 中国生物防治学报, 32(5): 604 – 609]

Lu YH, Yuan M, Gao XW, Wang H, 2013. Identification and validation of reference genes for gene expression analysis using quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS ONE*, 8(7): e68059.

Lu YH, Zhao YY, Zhang FC, Zheng XS, Zhu PY, Lu ZX, 2016b. Cloning and spatiotemporal and temperature-induced expression profiling of diapause bioclock protein TIME-EA4 gene in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Entomol. Sin.*, 59(4): 392 – 401. [鲁艳辉, 赵燕燕, 张发成, 郑许松, 朱平阳, 吕仲贤, 2016b. 二化螟滞育生物钟蛋白 TIME-EA4 基因的克隆及时空和温度诱导表达分析. 昆虫学报, 59(4): 392 – 401]

Lu YH, Zheng XS, Liang Q, Xu HX, Yang YJ, Tian JC, He XC, Lu ZX, 2015. Evaluation and validation of reference genes for SYBR Green qRT-PCR normalization in *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Asia-Pac. Entomol.*, 18(4): 669 – 675.

Newsholme EA, Beis I, Leech AR, Zammit VA, 1978. The role of creatine kinase and arginine kinase in muscle. *Biochem. J.*, 172(3): 533 – 537.

Peng SB, 2016. Dilemma and way-out of hybrid rice during the transition period in China. *Acta Agron. Sin.*, 42(3): 313 – 319. [彭少兵, 2016. 转型时期杂交水稻的困境与出路. 作物学报, 42(3): 313 – 319]

Qi XL, Su XF, Lu GQ, Liu CX, Liang GM, Cheng HM, 2015. The effect of silencing arginine kinase by RNAi on the larval development of *Helicoverpa armigera*. *Bull. Entomol. Res.*, 105(5): 555 – 565.

Sang S, Wang Z, Qi JW, Shu BS, Zhong GH, 2013. Research progresses on pesticide resistance of *Spodoptera litura*. *J. Environ. Entomol.*, 35(6): 808 – 814. [桑松, 王政, 齐江卫, 舒本水, 钟国华, 2013. 斜纹夜蛾抗药性研究进展. 环境昆虫学报, 35(6): 808 – 814]

Tanaka K, Ichinari S, Iwanami K, Yoshimatsu S, Suzuki T, 2007.

Arginine kinase from the beetle *Cissites cephalotes* (Olivier). Molecular cloning, phylogenetic analysis and enzymatic properties. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 37(4): 338 - 345.

Tu YG, Zeng JH, 2010. A method for artificial rearing of common cutworm, *Spodoptera litura*. *Acta Agric. Jiangxi*, 22(1): 87 - 88. [涂业苟, 曾吉华, 2010. 斜纹夜蛾的人工饲养技术. 江西农业学报, 22(1): 87 - 88]

Wang H, Zhang L, Zhang L, Lin Q, Liu NN, 2009. Arginine kinase: differentiation of gene expression and protein activity in the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Gene*, 430: 38 - 43.

Wang HB, Xu YS, 2006. cDNA cloning, genomic structure and expression of arginine kinase gene from *Bombyx mori* (L.). *Sci. Agric. Sin.*, 39(11): 2354 - 2361. [王华兵, 徐豫松, 2006. 家蚕精氨酸激酶基因的克隆、基因结构与表达分析. 中国农业科学, 39(11): 2354 - 2361]

Wang L, 2012. Analysis of Venom Proteomics and Four Venom Protein Physiological Functions in *Pteromalus puparum*. PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. [王磊, 2012. 蝶蛹金小蜂毒液蛋白质组与四个毒液蛋白生理功能的分析. 杭州: 浙江大学博士学位论文]

Werr M, Cramer JT, 2009. Identification and characterization of two arginine kinases from the parasitic insect *Ctenocephalides felis*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 39(9): 634 - 645.

Xu HX, Wang GR, Lu YH, Yang YJ, Zheng XS, Tian JC, Lü ZX, 2019. Screening reference genes and evaluating of their expression stability for qRT-PCR normalization in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralididae). *Chin. J. Rice Sci.*, 33(1): 75 - 84. [徐红星, 王国荣, 鲁艳辉, 杨亚军, 郑许松, 田俊策, 吕仲贤, 2019. 二化螟实时荧光定量 PCR 内参基因筛选和表达稳定性评价. 中国水稻科学, 33(1): 75 - 84]

Xu XF, 2012. Recombinant *Escherichia coli* Expressing dsDNA of Arginine Kinase Gene of *Plutella xylostella* and Its RNA-interference Effect. MSc Thesis, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou. [徐秀凤, 2012. 小菜蛾精氨酸激酶基因 dsRNA 在大肠杆菌中的表达及其效应. 福州: 福建农林大学硕士学位论文]

Yan H, Xia LX, Chen JJ, Liu J, Deng ZQ, Yi HT, Liu XP, 2011. Cloning, expression and purification of arginine kinase from *Blattella germanica* and its immune activity. *Chin. J. Parasitol. Parasit. Dis.*, 29(3): 191 - 194. [闫浩, 夏立新, 陈家杰, 刘娇, 邓志琼, 易海涛, 刘小平, 2011. 德国小蠊精氨酸激酶基因的克隆、表达及免疫活性测定. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 29(3): 191 - 194]

Yuan M, 2014. Selection of Potential Reference Genes in *Nilaparvata lugens* and the Molecular Characterization of Arginine Kinase Gene. PhD Dissertation, Huazhong Agricultural University, Wuhan. [袁淼, 2014. 褐飞虱内参基因的筛选及精氨酸激酶基因的分子特性研究. 武汉: 华中农业大学博士学位论文]

Zhang YC, An SH, Yuan GH, 2013. Advances in research on arginine kinase in insects. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 50(2): 533 - 538. [张元臣, 安世恒, 原国辉, 2013. 昆虫精氨酸激酶的研究进展. 应用昆虫学报, 50(2): 533 - 538]

Zheng YN, Liu PX, Shi Y, Fan LC, 2018. Advances in the research of arginine kinase in insects. *Acta Entomol. Sin.*, 61(3): 385 - 390. [郑雅楠, 刘佩旋, 时勇, 范立淳, 2018. 昆虫精氨酸激酶研究进展. 昆虫学报, 61(3): 385 - 390]

Zhu JY, 2009. Molecular Characterization of Venom from *Pteromalus puparum* and Molecular Mechanism of This Parasitoid Manipulation to Its Host. PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. [朱家颖, 2009. 蝶蛹金小蜂毒液分子特性及其调控寄主分子机理的研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文]

Zhu X, Yuan M, Shakeel M, Zhang YJ, Wang SL, Wang X, Zhan S, Kang TH, Li JH, 2014. Selection and evaluation of reference genes for expression analysis using qRT-PCR in the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS ONE*, 9(1): e84730.

(责任编辑：马丽萍)